



Yayasan Bina Patria Nusantara Malang

UNIVERSITAS TRIBHUWANA TUNGGADEWI MALANG

FAKULTAS PERTANIAN

Jl. Telaga Warna, Tlogomas, Malang 65144 - Indonesia, Telp. 0341 - 565500, Fax. 0341 - 565522

Program Studi : Agribisnis, Agroteknologi, Arsitektur Lansekap, Teknologi Industri Pertanian, Peternakan

SURAT REKOMENDASI

No. 5636 /TB.FP/KP-510/XI/2019

Dekan Fakultas Pertanian Universitas Tribhuwana Tungga Dewi Malang, dengan ini memberikan rekomendasi kepada :

Nama : Dr. Ir. Kgs Ahmadi, MP

NIP : 196512271991031004

Unit Kerja : LL Dikti dpk pada PS TIP Fakultas Pertanian Universitas Tribhuwana Tungga Dewi

Mengajukan paten dengan judul “Metode Pembuatan Fosfolipid Terstruktur Mengandung Asam Lemak Omega-3 dari Campuran Fosfolipid dan Konsentrat atau Minyak Kaya Asam Lemak Omega-3” sebagai anggota inventor untuk diajukan sebagai kum dalam pengusulan jabatan Guru Besar. Paten yang telah di Ganted sesuai dengan bidang keahlian dan mata kuliah yang diampu. Bersama surat rekomendasi ini disertakan sertifikat paten dan bukti fisik (deskripsi paten).

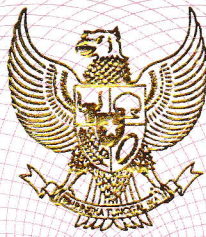
Demikian Surat Rekomendasi ini dibuat untuk digunakan sebagaimana mestinya

Malang, 13 November 2019

Dekan,

Dr. Ir. Amir Hamzah, MP

NIP. 19670527 200501 100



**REPUBLIK INDONESIA
KEMENTERIAN HUKUM DAN HAK ASASI MANUSIA**

SERTIFIKAT PATEN

Menteri Hukum dan Hak Asasi Manusia atas nama Negara Republik Indonesia berdasarkan Undang-Undang Nomor 14 Tahun 2001 tentang Paten, memberikan Paten kepada:

Nama dan Alamat
Pemegang Paten

: LEMBAGA PENELITIAN DAN PENGEMBANGAN KEPADA
MASYARAKAT
(LPPM) UNIVERSITAS BRAWIJAYA
Jl. Veteran No.1 Malang 65145
INDONESIA

Untuk Invensi dengan
Judul

: METODE PEMBUATAN FOSFOLIPID TERSTRUKTUR
MENGANDUNG ASAM LEMAK OMEGA-3 DARI
CAMPURAN FOSFOLIPID DAN KONSENTRAT ATAU
MINYAK KAYA ASAM LEMAK OMEGA-3

Inventor

Dr. Teti Estiasih, STP, MP.
Ir. Kgs. Ahmadi, MP.
Jaya Mahar Maligan, STP.
Mokhamad Nur, STP, MSc.

Tanggal Penerimaan

: 11 November 2011

Nomor Paten

: IDP000038453

Tanggal Pemberian

: 04 Mei 2015

Perlindungan Paten untuk invensi tersebut diberikan untuk selama 20 tahun terhitung sejak Tanggal Penerimaan (Pasal 8)

Sertifikat Paten ini dilampiri dengan deskripsi, klaim, abstrak dan gambar (jika ada) dari invensi yang tidak terpisahkan dari sertifikat ini.



00-2015-98748

a.n. MENTERI HUKUM DAN HAK ASASI MANUSIA
REPUBLIK INDONESIA
DIREKTUR JENDERAL KEKAYAAN INTELEKTUAL
u.b.

Direktur Paten

Ir. Timbul Sinaga, M.Hum.
NIP. 196202021991031001

(12)	PATEN INDONESIA	(11)	IDP000038453	(13) B
(19)	DIREKTORAT JENDERAL KEKAYAAN INTELEKTUAL	(45)	04 May 2015	
(51)	Klasifikasi IPC : C11B 1/02, C12P 7/00	(71)	Nama dan Alamat yang Mengajukan Permohonan Paten : LEMBAGA PENELITIAN DAN PPENGEMBANGAN KEPADA MASYARAKAT (LPPM) UNIVERSITAS BRAWIJAYA, Jl. Veteran No. 1 Malang 65145 INDONESIA (u.p. Dr. Ir. Purwadi, MS), ID	
(21)	No. Permohonan Paten : P00201100689	(72)	Nama Inventor : Ir. Kgs. Ahmadi, MP., ID Mokhamad Nur, STP, MSc., ID Jaya Mahar Maligan, STP., ID Dr. Teti Estiasih, STP, MP., ID	
(22)	Tanggal Penerimaan : 11 Nov 2011	(74)	Nama dan Alamat Konsultan Paten : - - -	
(30)	Data Prioritas : (31) Nomor (32) Tanggal (33) Negara		Pemeriksa Paten : Ir. Ahmad Fauzi Tanjung	
(43)	Tanggal Pengumuman : 30 May 2013		Jumlah Klaim : 5	
(56)	Dokumen Pembanding : -			
(54)	Judul Invensi : METODE PEMBUATAN FOSFOLIPID TERSTRUKTUR MENGANDUNG ASAM LEMAK OMEGA-3 DARI CAMPURAN FOSFOLIPID DAN KONSENTRAT ATAU MINYAK KAYA ASAM LEMAK OMEGA-3			
(57)	Abstrak :			

Invensi ini bertujuan untuk mendapatkan fosfolipid terstruktur mengandung asam lemak omega-3 dari campuran fosfolipid dan campuran asam lemak. Campuran fosfolipid berupa fosfolipid kasar serat sawit atau lesitin kedelai komersial, sedangkan campuran asam lemak berupa konsentrat asam lemak omega-3 atau minyak kaya asam lemak omega-3. Sumber minyak yang digunakan adalah minyak hasil samping pengalengan dan penepungan lemuru dan tuna. Metode sintesis fosfolipid terstruktur mengandung asam lemak omega-3 dengan tahapan sebagai berikut: melarutkan melarutkan campuran fosfolipid dan campuran asam lemak dalam pelarut dengan rasio asam lemak:fosfolipid berkisar 3,56-3,72:1 atau 3,5:1; menambahkan enzim lipase dari Rizomucor miehei pada konsentrasi 20 atau 30%; menambahkan air sebesar 10% dari berat substrat; melakukan inkubasi pada suhu 40°C dan digoyang pada 300 rpm selama 23,64-25,10 jam atau 18 jam; melakukan sentrifugasi untuk mengendapkan fosfolipid; dan melakukan pencucian fosfolipid terstruktur dengan heksana. Fosfolipid terstruktur mengandung asam lemak omega-3 yang diperoleh mengandung EPA dan DHA kadar EPA+DHA sebesar 21,29-35,97% atau 46,39-51,58%.

No Image Available

Deskripsi

METODE PEMBUATAN FOSFOLIPID TERSTRUKTUR MENGANDUNG ASAM LEMAK OMEGA-3 DARI CAMPURAN FOSFOLIPID DAN KONSENTRAT ATAU MINYAK KAYA ASAM LEMAK OMEGA-3

Bidang Teknik Invensi

Invensi ini berhubungan dengan metode sintesis fosfolipid terstruktur dari lesitin kedelai komersial atau fosfolipid kasar serat sawit (*palm pressed fiber*) dan konsentrat atau minyak kaya asam lemak omega-3. Konsentrat atau minyak kaya asam lemak omega-3 dibuat dari minyak hasil samping pengolahan ikan berupa minyak hasil samping pengalengan dan penepungan tuna dan lemuru. Fosfolipid yang digunakan merupakan campuran fosfolipid.

Latar Belakang Invensi

Metode sintesis fosfolipid terstruktur bertujuan untuk mendapatkan campuran fosfolipid yang mengandung asam lemak omega-3 terutama EPA dan DHA yang dapat digunakan sebagai pengemulsi *nutraceutical*, antioksidan, dan sediaan untuk berbagai terapi dan pencegahan penyakit.

Metode sintesis fosfolipid terstruktur dilakukan dengan metode asidolisis enzimatis antara campuran fosfolipid (dari lesitin kedelai komersial atau fosfolipid kasar serat sawit) dengan asam lemak bebas dalam bentuk konsentrat asam lemak omega-3 atau minyak kaya asam lemak omega-3. Konsentrat asam lemak omega-3 dibuat dengan menggunakan teknik kristalisasi urea sedangkan minyak kaya asam lemak omega-3 dibuat dengan metode pemadatan cepat.

Metode asidolisis enzimatis dilakukan dengan menggunakan lipase dari *Mucor miehei* pada konsentrasi 20% berdasarkan berat substrat jika menggunakan konsentrat asam lemak omega-3 sebagai sumber asil dan fosfolipid kasar serat sawit, dan kisaran 20-40% berdasarkan berat substrat jika menggunakan lesitin kedelai komersial dan minyak kaya asam lemak omega-3 sebagai sumber asil.

Inkorporasi asam lemak omega-3 pada struktur fosfolipid terjadi karena lipase merupakan enzim yang bisa menghidrolisis dan menginkorporasikan asam lemak pada struktur fosfolipid. Hidrolisis oleh enzim lipase *M. miehei* terjadi pada sn-1 sehingga asam lemak omega-3 juga diinkorporasikan pada posisi tersebut walaupun migrasi asil pada posisi sn-2 dapat terjadi. Jenis fosfolipid yang digunakan adalah campuran berbagai jenis fosfolipid yang terdiri

dari fosfatidilinositol, fosfatidilkolin, fosfatidiletanolamin, fosfatidilgliserol, dan asam fosfatidat untuk fosfolipis serat sawit, dan fosfatidilinositol, fosfatidiletanolamin, fosfatidilkolin, dan asam fosfatidat untuk lesitin kedelai komersial.

Inkorporasi asam lemak omega-3 terhadap EPA dan DHA pada jenis-jenis fosfolipid bersifat acak. Terdapat preferensi jenis fosfolipid untuk diinkorporasi oleh asam lemak omega-3 yaitu fosfatidiletanolamin baik fosfolipid kasar serat sawit maupun lesitin kedelai komersial.

Invensi terdahulu untuk memperoleh fosfolipid terstruktur mengandung asam lemak omega-3 menggunakan jenis fosfolipid murni seperti fosfatidilkolin (PC) kaya dengan asam palmitat dan stearat disintesis melalui proses transesterifikasi yang dikatalisis oleh lipase, dengan PC yang digunakan diisolasi dari kuning telur dan lesitin kedelai (Reddy *et al.*, 2005, J. Am. Oil Chem. Soc. 82: 727-730); sintesis PC mengandung EPA dan DHA dengan sumber PC adalah kuning telur. dengan menggunakan konsentrat asam lemak ω -3 sebagai sumber asil (Haraldsson dan Thorarensen, 1999, J. Am. Oil Chem. Soc. 76(10): 1143-1149); dan hampir sebagian besar penelitian tentang reaksi asidolisis dalam sintesis fosfolipid menggunakan fosfolipid atau fosfatidilkolin murni sebagai substrat (Muhranta *et al.*, 1994, J. Am. Oil Chem. Soc. 71: 1415-1419; Hosokawa *et al.*, 1995, J. Am. Oil Chem. Soc. 72: 421-425; Aura *et al.*, 1995, J. Am. Oil Chem. Soc. 72: 1375-1379; Haraldsson and Thorarensen, 1999; Adlercreutz and Wehtje, 2004, J. Am. Oil Chem. Soc. 81: 553-557; Reddy *et al.*, 2005; Lin *et al.*, 2005, J. Am. Oil Chem. Soc. 82: 495-499).

Dari penelusuran paten produk lipid terstruktur mengandung asam lemak ω -3 di Amerika Serikat tidak ditemukan adanya paten sejenis tetapi terdapat beberapa paten yang berkaitan dengan fosfolipid sebagai berikut:

Harbige *et al.* (2009) mempatenkan metode untuk terapi pasien dengan sitokinin mengalami disregulasi atau dengan kata lain memodulasi untuk mendapatkan keuntungan teurapeutik dengan cara memberikan asupan fosfolipid yang mempunyai gugus fosfatidil yang teresterifikasi dengan satu atau lebih gugus asam lemak. Fosfolipid paling sedikit mempunyai gugus asam lemak pada posisi sn-1 atau sn-2, dengan jenis asam lemak yang dipilih adalah γ linoleil, asam dihomog γ linoleil, dan arakhidonoil (US 20090036410A1).

Dror *et al.* (2008) mempatenkan fosfatidilserin mengandung asam lemak omega-3 atau omega-6 dengan cara transesterifikasi atau esterifikasi secara kimiawi maupun enzimatis sehingga pada posisi sn-1 dan sn-2 mengandung asam lemak omega-3 atau omega-6, dan kemudian dilakukan transesterifikasi gugus serin dengan menggunakan fosfolipase D sehingga diperoleh serin mengandung asam lemak omega-3 atau omega-6 (US 2008/0085320 A1).

Hirasutka *et al.* (2007) telah mempatenkan metode untuk ekstraksi lipid tinggi fosfolipid

yang mengandung asam lemak tidak jenuh (PUFA). Metode ekstraksi tersebut meliputi pemanasan *viscera* ikan dengan air atau uap air panas, ekstraksi menggunakan pelarut dan campuran lipid yang dihasilkan tinggi fosfolipid yang mengandung PUFA. Fosfolipid yang diperoleh terdiri dari fosfatidilserin dan fosfatidiletanolamin yang mengandung tinggi DHA
 5 (*United State Patent: 7,189,418*).

Llewellyn (2007) mempatenkan formula untuk meningkatkan massa otot yang mengandung fosfolipid yang mengandung asam arakhidonat (*United State Paten: 7,199,112*). Lopez-Berestein *et al.* (2007) mempatenkan sistem deliveri *antisense* yang terdiri dari liposom yang mengandung fosfolipid (*United State Patent: 7,176,302*).

10 Schmitt *et al.* (2007) mempatenkan proses modifikasi enzimatis terhadap lesitin dengan cara hidrolisis. Produk lesitin terhidrolisis yang dihasilkan mengandung fosfolipid terhidrolisis, monogliserida dan digliserida. Teknik ini meliputi kontak bahan mengandung lesitin, termasuk fosfolipid dan trigliserida, dalam pelarut akueous atau organik dengan enzim pertama yang efektif menghidrolisis fosfolipid. Kemudian bahan dikontakkan dengan enzim kedua yang
 15 efektif menghidrolisis trigliserida dalam suatu kondisi yang mencegah esterifikasi fosfolipid terhidrolisis dengan asam lemak bebas yang dihasilkan (*United State Patent: 7,189, 544*).

Choo *et al.* (2006) mempatenkan metode rekovery fitonutrien sawit mengandung karoten dan fosfolipid. Metode ini meliputi distilasi vakum dan purifikasi konsentrat fitonutrien (*United States Patent: 7,141,712*).

20 Asidolisis enzimatis yang telah dilakukan menggunakan fosfolipid murni dan asam lemak murni sehingga biayanya tinggi. Oleh karena itu, pada invensi ini dilakukan sintesis fosfolipid terstruktur dari campuran fosfolipid dan campuran asam lemak sebagai sumber asil yang mengandung asam lemak omega-3 tinggi.

Tujuan invensi ini adalah menyediakan metode sintesis fosfolipid terstruktur
 25 mengandung asam lemak omega-3 dari campuran fosfolipid dan campuran asam lemak.

Uraian Singkat Invensi

Invensi ini menghasilkan metode sintesis fosfolipid terstruktur dari campuran fosfolipid dan campuran asam lemak dengan menggunakan metode asidolisis enzimatis. Bahan baku yang
 30 digunakan adalah fosfolipid dari serat sawit dan konsentrat asam lemak omega-3 dari hasil samping pengalengan dan penepungan tuna dan lemuru, serta fosfolipid dari lesitin kedelai komersial dan minyak kaya asam lemak omega-3 dari hasil samping pengalengan tuna.

Metode sintesis fosfolipid mengandung asam lemak omega-3 dari fosfolipid kasar serat sawit dan konsentrat asam lemak omega-3 dari minyak hasil samping pengalengan dan penepungan tuna dan lemuru terdiri dari tahapan sebagai berikut:

- a. membuat konsentrat asam lemak omega-3 dengan menggunakan teknik kristalisasi urea.
- 5 b. memasukkan konsentrat asam lemak ω -3 dan fosfolipid kasar serat sawit pada tabung reaksi tertutup dengan rasio 3,66:1 untuk konsentrat asam lemak omega-3 dari hasil samping pengalengan dan penepungan lemuru, 3,72:1 untuk konsentrat asam lemak omega-3 dari hasil samping pengalengan tuna, 3,56:1 untuk konsentrat asam lemak omega-3 dari hasil samping penepungan tuna.
- 10 c. menambahkan enzim Lipozyme (*Rhizomucor meihei*) ditambahkan dengan konsentrasi 20% (terhadap substrat), air 10%, dan heksana 3 ml.
- d. melakukan inkubasi campuran dalam *water-bath* kecepatan 300 rpm pada suhu 40°C dengan waktu inkubasi 24,94 jam untuk konsentrat asam lemak omega-3 dari minyak hasil samping pengalengan lemuru, 26,56 jam untuk konsentrat asam lemak omega-3 dari minyak hasil samping penepungan lemuru, 24,46 jam untuk konsentrat asam lemak omega-3 dari minyak hasil samping pengalengan tuna, dan 23,36 jam untuk konsentrat asam lemak omega-3 dari minyak hasil samping penepungan tuna.
- 15 e. melakukan sentrifugasi campuran reaksi pada kecepatan 3000 rpm selama 15 menit untuk mengendapkan fosfolipid terstruktur.
- 20 f. mencuci fosfolipid terstruktur menggunakan 1 ml heksana.
- g. diperoleh fosfolipid terstruktur mengandung asam lemak omega-3

Metode sintesis fosfolipid mengandung asam lemak omega-3 dari lesitin kedelai komersial dan minyak kaya asam lemak omega-3 dari minyak hasil samping pengalengan tuna terdiri dari tahapan sebagai berikut:

- a. membuat minyak kaya asam lemak omega-3 dari minyak hasil samping pengalengan tuna dengan menggunakan teknik pemadatan cepat setelah minyak disaponifikasi dan diasamkan sehingga diperoleh asam lemak bebas
- b. melakukan penghilangan minyak lesitin kedelai komersial dengan pencucian menggunakan aseton sampai minyak tidak terdeteksi
- 25 c. memasukkan minyak kaya asam lemak ω -3 dan lesitin kedelai komersial pada tabung reaksi tertutup dengan rasio 3,5:1
- 30 d. menambahkan enzim Lipozyme (*Rhizomucor meihei*) ditambahkan dengan konsentrasi 30% (terhadap substrat), air 10%, dan heksana 3 ml.

- e. melakukan inkubasi campuran dalam *water-bath* kecepatan 300 rpm pada suhu 40°C dengan waktu inkubasi 18 jam
- f. melakukan sentrifugasi campuran reaksi pada kecepatan 3000 rpm selama 15 menit untuk mengendapkan fosfolipid terstruktur.
- 5 g. mencuci fosfolipid terstruktur menggunakan 1 ml heksana.
- h. diperoleh fosfolipid terstruktur mengandung asam lemak omega-3

Uraian Lengkap Invensi

10 Sumber fosfolipid yang digunakan adalah fosfolipid kasar serat sawit atau lesitin kedelai komersial, dan sumber asil yang digunakan adalah konsentrat asam lemak omega-3 atau minyak kaya asam lemak omega-3 dari minyak hasil samping pengalengan dan penepungan lemuru dan tuna. Minyak hasil samping pengolahan tuna mempunyai keunggulan tinggi asam dokosaheksaenoat (DHA, *docosahexaenoic acid*) dan minyak hasil samping pengolahan lemuru
15 mempunyai keunggulan tinggi asam eikosapentaenoat (EPA, *eicosapentaenoic acid*).

Invensi dilakukan dalam dua bagian yang terpisah yaitu sintesis fosfolipid terstruktur dari fosfolipid sawit dan konsentrat asam lemak omega-3 dari minyak hasil samping pengalengan dan penepungan lemuru dan tuna, serta sintesis fosfolipid terstruktur dari lesitin kedelai komersial dari minyak kaya asam lemak omega-3.

20 Invensi bagian pertama dilakukan dalam tiga tahap, yaitu ekstraksi fosfolipid dari serat sawit, pembuatan konsentrat asam lemak omega-3, dan sintesis fosfolipid terstruktur mengandung asam lemak omega-3. Masing-masing dilakukan dengan pentahapan sebagai berikut:

Ekstraksi fosfolipid dari serat sawit dilakukan dengan menggunakan kloroform-metanol.
25 Sebelum dilakukan ekstraksi fosfolipid, total lipid dari serat sawit diekstraksi terlebih dahulu. Ekstraksi total lipid dilakukan sebagai berikut: Sejumlah 100 g limbah pengolahan sawit diekstrak 2 kali dengan 100 ml kloroform:metanol (2:1 v/v) dan sekali dengan 100 ml kloroform:metanol (1:2 v/v) selama 1 jam pada suhu ruang kemudian disaring. Semua ekstrak kemudian dicampur dan disentrifugasi. Setelah sentrifugasi pada 3000 rpm selama 15
30 menit, fase paling bawah dipekatkan dengan rotavapor. Total lipid yang diperoleh kemudian ditimbang dan digunakan untuk separasi fosfolipid kasar. Total lipid yang diperoleh adalah 4,74%.

Ekstraksi fosfolipid dari total lipid dilakukan sebagai berikut: Total lipid yang diperoleh dari proses ekstraksi diekstrak dengan menggunakan kloroform. Sebanyak 10 g total lipid

diekstrak dengan 40 ml kloroform. Fraksi yang larut kloroform merupakan lipid non polar dan dipisahkan dengan sentrifugasi pada kecepatan 5000 rpm selama 10 menit. Fraksi yang tidak larut merupakan lipid polar dan dipisahkan. Fraksi yang larut kemudian dikeringkan dengan menggunakan nitrogen/aerasi dan diekstrak kembali dengan 30 ml kloroform. Setelah itu dilakukan sentrifugasi untuk memisahkan fraksi larut dan tidak larut. Fraksi tidak larut merupakan lipid polar dan dicampur dengan fraksi tidak larut dari hasil ekstraksi pertama. Selanjutnya fraksi tidak larut kloroform diekstrak dengan menggunakan 20 ml metanol untuk melarutkan fosfolipid/lipid polar. Fraksi larut dan tidak larut dipisahkan dengan sentrifugasi pada 5000 rpm selama 10 menit. Fraksi yang larut kemudian dikeringkan untuk mengambil padatan yang merupakan fosfolipid. Kadar fosfolipid yang diperoleh dalam ekstrak fosfolipid adalah 61,67%.

Pembuatan konsentrat asam lemak omega-3 dari minyak hasil samping pengolahan ikan, berupa hasil samping pengalengan dan penepungan lemuru dan tuna, adalah sebagai berikut:

15 **a. Saponifikasi**

Sebanyak 1000 g minyak hasil samping pengolahan ikan dicampur dengan 2000 ml larutan NaOH dalam air/etanol dan diaduk selama 30 menit pada suhu 60°C. Setelah saponifikasi ditambahkan 400 ml air. Larutan NaOH disiapkan dengan cara melarutkan 480 g NaOH dan 5 g Na₂EDTA dalam 1600 ml air. Ke dalam larutan ini ditambahkan 1600 ml etanol.

20 **b. Ekstraksi asam lemak**

Heksana sebanyak 4000 ml ditambahkan dan diaduk selama 1 jam. Lapisan atas (sekitar 1600 ml) mengandung bahan tidak tersabunkan dan dibuang. HCl pekat ditambahkan pada lapisan bawah dan diaduk sampai pH mencapai 1. Dua lapisan akan terbentuk. Lapisan bawah dibuang dan lapisan atas (lapisan heksana) diambil dan dievaporasi sampai semua pelarut habis pada suhu 30°C.

c. Kristalisasi urea

Asam lemak ditambahkan pada larutan urea panas (suhu 60-65°C) dalam metanol dengan diaduk pada kecepatan konstan. Volume metanol yang digunakan adalah 200 ml untuk minyak ikan asal sejumlah 25 g. Rasio urea:asam lemak bebas adalah 2,06:1 untuk minyak hasil samping pengalengan lemuru; 2,59:1 untuk minyak hasil samping penepungan lemuru; 2,99:1 untuk minyak hasil samping pengalengan tuna; dan 3,07:1 untuk minyak hasil samping penepungan tuna. Jika diperlukan larutan dipanaskan sampai jernih. Urea dibiarkan membentuk kristal dengan asam lemak pada lama kristalisasi 24,73 jam untuk minyak hasil samping pengalengan lemuru; 24,30 jam untuk minyak hasil samping penepungan lemuru; 23,64 jam

untuk minyak hasil samping pengalengan tuna; dan 25,10 jam untuk minyak hasil samping penepungan tuna. Kristal urea yang terbentuk dipisahkan dari larutan induk dengan penyaringan. Asam lemak dalam filtrat kemudian diekstraksi.

d. Ekstraksi asam lemak ω -3

5 Untuk setiap 3 liter filtrat, ditambahkan 1 liter heksana dan 0,5 liter HCl pekat. Campuran diaduk selama 1 jam. Lapisan heksana dipisahkan. Sebanyak 1,5 liter air ditambahkan pada lapisan bawah. Lapisan ini kemudian diekstrak kembali dengan 1 liter heksana. Kedua ekstrak tersebut kemudian dicampurkan. Heksana dipisahkan dengan asam lemak melalui evaporasi pada suhu 30°C.

10 Konsentrat asam lemak omega-3 yang dihasilkan mempunyai kadar EPA+DHA sebesar 54,66% untuk minyak hasil samping pengalengan lemuru; 52,80% untuk minyak hasil samping penepungan lemuru; 46,07% untuk minyak hasil samping pengalengan tuna; dan 45,12% untuk minyak hasil samping penepungan tuna.

15 Sintesis fosfolipid terstruktur mengandung asam lemak omega-3 melalui optimasi reaksi asidolisis enzimatis dilakukan sebagai berikut:

Konsentrat asam lemak ω -3 (rasio diatur sesuai perlakuan) dan fosfolipid kasar serat sawit (80 mg) dimasukkan tabung reaksi tertutup. Enzim Lipozyme (*Rhizomucor meihei*) ditambahkan dengan konsentrasi 20% (terhadap substrat), air 10%, dan heksana 3 ml. Campuran digoyang perlahan dalam *water-bath* kecepatan 300 rpm pada suhu 40°C selama 20 waktu tertentu sesuai perlakuan. Setelah inkubasi, campuran reaksi disentrifugasi pada kecepatan 3000 rpm selama 15 menit untuk mengendapkan fosfolipid terstruktur. Kemudian dilakukan pencucian menggunakan 1 ml heksana.

Proses optimasi dilakukan dengan menggunakan Rancangan Komposit Pusat. Faktor yang diteliti pada penelitian ini adalah rasio substrat (konsentrat asam lemak:fosfolipid) (X_1) dan 25 lama reaksi (X_2) dengan konsentrasi enzim 20% dari berat substrat. Respon yang dioptimasi untuk kedua jenis fosfolipid terstruktur yang dihasilkan adalah kadar asam lemak ω -3 (EPA+DHA) dalam struktur fosfolipid.

Hasil invensi ini diperoleh bahwa kondisi optimum untuk sintesis fosfolipid terstruktur dari fosfolipid kasar serat sawit dan konsentrat asam lemak ω -3 dari hasil samping pengalengan 30 lemuru mempunyai adalah rasio asam lemak:fosfolipid kasar 3,66:1 dan lama sintesis 24,94 jam atau 24 jam 57 menit. Respon kadar EPA+DHA pada kondisi optimum ini diprediksi sebesar 412,408 (mg/100 g) dengan tingkat penggabungan asam lemak ω -3 sebesar 27,58%. Fosfolipid terstruktur dari fosfolipid kasar serat sawit dan konsentrat asam lemak ω -3 dari hasil samping penepungan lemuru mempunyai kondisi optimum sintesis pada rasio asam lemak:fosfolipid

kasar 3,66:1 dan lama sintesis 26,55 jam atau 26 jam 33 menit. Respon kadar EPA+DHA pada kondisi optimum ini diprediksi sebesar 658,37 (mg/100 g). Tingkat inkorporasi asam lemak ω -3 pada struktur fosfolipid mencapai 21,29%.

Fosfolipid terstruktur dari fosfolipid kasar serat sawit dan kosentrat asam lemak ω -3 dari hasil samping pengalengan tuna mempunyai kondisi optimum yang diperoleh pada rasio asam lemak:fosfolipid 3,72:1 dan lama sintesis 24,46 jam atau 24 jam 28 menit. Respon kadar EPA+DHA pada kondisi optimum ini diprediksi sebesar 764,898 (mg/100 g) dengan tingkat penggabungan asam lemak ω -3 sebesar 30,45%. Fosfolipid terstruktur dari fosfolipid kasar serat sawit dan kosentrat asam lemak ω -3 dari hasil samping pengalengan tuna mempunyai kondisi optimum yang diperoleh pada rasio asam lemak:fosfolipid rasio urea:asam lemak 3,56:1 dan lama kristalisasi 23,63 jam atau 23 jam 38 menit. Respon kadar EPA+DHA pada kondisi optimum ini diprediksi sebesar 731,67 (mg/100 g). Tingkat inkorporasi asam lemak ω -3 pada struktur fosfolipid mencapai 35,97%.

Profil asam lemak fosfolipid terstruktur mengandung asam lemak omega-3 dari kosentrat asam lemak omega-3 dari berbagai minyak hasil samping pengolahan ikan dapat dilihat pada Tabel 1.

Tabel 1. Komposisi asam lemak berbagai fosfolipid terstruktur mengandung asam lemak omega-3 dengan sumber asil kosentrat asam lemak omega-3 dari minyak hasil samping pengalengan dan penepungan lemuru dan tuna

Jenis Asam Lemak	Pengalengan Lemuru	Penepungan Lemuru	Pengalengan Tuna	Penepungan Tuna
Kaproat	td	td	td	td
Kaprilat	td	td	td	td
Kaprat	td	td	td	td
Laurat	1,63	2,28	1,81	2,22
Miristat	9,89	9,57	5,65	5,53
Palmitat	13,98	12,26	10,45	9,20
Palmitooleat	14,50	18,42	13,20	13,28
Stearat	20,62	25,85	23,85	16,73
Oleat	1,78	2,68	1,38	0,56
Linoleat	5,25	4,17	6,04	13,47
Linolenat	4,77	3,49	6,77	3,03
EPA (C20:5 ω -3)	17,04	14,71	11,11	10,94
Arakhidat	td	td	Td	td
DHA (C22:6 ω -3)	10,54	6,58	19,34	25,03
C22:1	td	Td	0,39	td
EPA+DHA	27,58	21,29	30,45	35,97

Tingkat inkorporasi asam lemak ω -3 pada jenis-jenis fosfolipid terstruktur dari fosfolipid kasar serat sawit berbeda-beda tetapi mempunyai pola yang sama untuk sumber asil empat jenis

konsentrat asam lemak ω -3 yang berbeda. Tingkat inkorporasi tertinggi terdapat pada fosfatidiletanolamin yang mencapai 51,20% untuk sumber asil konsentrat asam lemak ω -3 dari hasil samping pengalengan lemuru, 38,34% untuk penepungan lemuru, 51,20% untuk pengalengan tuna, dan 57,18% untuk penepungan tuna.

5

Invensi bagian kedua adalah sintesis fosfolipid terstruktur dari lesitin kedelai komersial dan minyak kaya asam lemak omega-3 dari hasil samping pengalengan tuna. Invensi ini terdiri dari tiga tahapan yaitu penghilangan minyak lesitin kedelai, preparasi minyak kaya asam lemak omega-3, dan sintesis fosfolipid terstruktur mengandung asam lemak omega-3 melalui reaksi asidolisis enzimatis.

10

Penghilangan minyak dari lesitin kedelai komersial dilakukan sebagai berikut: Proses penghilangan minyak ditujukan untuk mendapatkan fosfolipid kedelai yang lebih murni. Lesitin/fosfolipid kedelai sebanyak 25 g dilarutkan dalam aseton 150 ml dan diaduk dengan pengaduk magnet selama 1 jam. Pelarut yang mengandung lipid netral dipisahkan dengan dekantasi, kemudian proses diulang sampai pelarut tidak berwarna. Minyak yang masih mengkontaminasi fosfolipid dicek dengan menggunakan TLC. Jika masih terdapat banyak minyak, maka dilakukan kembali pencucian seperti sebelumnya. Lipid polar/fosfolipid yang diperoleh digunakan untuk sintesis fosfolipid terstruktur.

15

Preparasi minyak kaya asam lemak omega-3 dari minyak hasil samping pengalengan tuna dilakukan sebagai berikut:

20

a. Saponifikasi

Sebanyak 1000 g minyak hasil samping pengolahan ikan dicampur dengan 2000 ml larutan NaOH dalam air/etanol dan diaduk selama 30 menit pada suhu 60°C. Setelah saponifikasi ditambahkan 400 ml air. Larutan NaOH disiapkan dengan cara melarutkan 480 g NaOH dan 5 g Na₂EDTA dalam 1600 ml air. Ke dalam larutan ini ditambahkan 1600 ml etanol.

25

b. Ekstraksi asam lemak

Heksana sebanyak 4000 ml ditambahkan dan diaduk selama 1 jam. Lapisan atas (sekitar 1600 ml) mengandung bahan tidak tersabunkan dan dibuang. HCl pekat ditambahkan pada lapisan bawah dan diaduk sampai pH mencapai 1. Dua lapisan akan terbentuk. Lapisan bawah dibuang dan lapisan atas (lapisan heksana) diambil dan dievaporasi sampai semua pelarut habis pada suhu 30°C.

30

c. Kristalisasi pelarut suhu rendah

Minyak (dalam bentuk asam lemak bebas) dari hasil ekstraksi asam lemak dilarutkan dalam aseton dengan rasio minyak:etanol 1:6 (b/v). Campuran minyak-aseton tersebut kemudian

diinkubasi pada *freezer* bersuhu -40°C selama 24 jam. Setelah 24 jam, kristal yang terbentuk dipisahkan dari pelarut dengan cara penyaringan pada suhu rendah. Selanjutnya, minyak yang tidak mengkristal dipisahkan dari pelarut dengan cara evaporasi vakum.

Sintesis fosfolipid terstruktur mengandung asam lemak omega-3 antara fosfolipid dari lesitin kedelai komersial yang telah dihilangkan minyaknya dan minyak kaya asam lemak omega-3 dari hasil samping pengalengan tuna dilakukan sebagai berikut: Pada tahap reaksi asidolisis enzimatis ini faktor yang dikaji adalah lama reaksi dan konsentrasi enzim lipase *Rhizomucor miehei* yang digunakan. Minyak kaya asam lemak omega-3 dan fosfolipid kedelai yang sudah dihilangkan minyaknya (rasio asam lemak: fosfolipid 3,5:1 atau 280 mg:80 mg) dimasukkan tabung reaksi tertutup. Enzim Lipozyme (*Rhizomucor meihei*) ditambahkan dengan konsentrasi 20, 30, 40% (terhadap substrat, sesuai perlakuan), air 10%, dan heksana 3 ml. Campuran digoyang perlahan dalam *water-bath* kecepatan 300 rpm pada suhu 40°C selama waktu tertentu sesuai perlakuan yaitu 18, 24, dan 36 jam. Setelah inkubasi, campuran reaksi disentrifugasi pada kecepatan 3000 rpm selama 15 menit untuk mengendapkan fosfolipid terstruktur. Kemudian dilakukan pencucian menggunakan 1 ml heksana.

Hasil invensi ditunjukkan pada Tabel 2 yang menunjukkan bahwa komposisi asam lemak fosfolipid terstruktur dipengaruhi lama reaksi dan konsentrasi enzim.

Tabel 2. Komposisi asam lemak (%) fosfolipid terstruktur pada berbagai konsentrasi enzim dan lama reaksi

Jenis	18 jam			24 jam			36 jam		
	20%	30%	40%	20%	30%	40%	20%	30%	40%
C12:0	0,09	0,10	0,07	0,15	0,34	0,05	0,54	-	0,06
C14:0	3,83	3,36	3,97	3,75	4,29	5,79	3,92	3,89	3,64
C16:0	7,25	7,36	8,09	7,56	7,65	8,68	8,14	7,53	7,17
C18:0	2,00	1,73	1,86	1,87	2,02	1,93	2,09	1,66	1,86
C18:1	24,80	23,77	25,37	24,30	21,48	25,30	25,12	24,00	24,63
C18:2	9,20	9,63	10,17	10,22	10,13	10,11	10,49	10,80	10,31
C18:3	1,75	1,78	1,49	1,58	1,87	1,97	1,45	1,67	1,62
C20:4	0,51	1,23	0,70	0,77	0,63	0,13	1,86	0,63	0,76
EPA	8,86	8,40	8,31	8,93	9,62	8,34	8,15	9,03	8,42
DHA	41,72	42,64	39,96	40,86	41,96	37,70	38,24	40,79	41,52
EPA+DHA	50,57	51,04	48,27	49,79	51,58	46,04	46,39	49,82	49,94

Klaim

1. Suatu metode sintesis fosfolipid terstruktur mengandung asam lemak omega-3 dari campuran fosfolipid dan campuran asam lemak, dengan tahapan sebagai berikut:

- a. melarutkan melarutkan campuran fosfolipid dan campuran asam lemak dalam pelarut;
- b. menambahkan enzim lipase dari *Rizomucor miehei*;
- c. menambahkan air;
- d. melakukan inkubasi pada suhu 40°C dan digoyang pada 300 rpm;
- 5 e. melakukan sentrifugasi untuk mengendapkan fosfolipid;
- f. melakukan pencucian fosfolipid terstruktur dengan heksana.
2. Suatu metode sintesis fosfolipid terstruktur mengandung asam lemak omega-3, dimana pelarut yang digunakan adalah heksana
3. Suatu metode sintesis fosfolipid terstruktur mengandung asam lemak omega-3 seperti pada
- 10 klaim 1 dan 2, dimana jumlah air yang ditambahkan adalah 10% terhadap berat substrat.
4. Suatu metode sintesis fosfolipid terstruktur mengandung asam lemak omega-3 seperti pada klaim 1, 2, dan 3, dengan konsentrasi enzim yang digunakan adalah 20 atau 30%% terhadap berat substrat.
5. Suatu metode sintesis fosfolipid terstruktur mengandung asam lemak omega-3 seperti klaim
- 15 1, dimana campuran fosfolipid yang digunakan adalah fosfolipid dari serat sawit atau lesitin kedelai komersial yang telah dihilangkan minyaknya.
6. Suatu metode sintesis fosfolipid terstruktur mengandung asam lemak omega-3 seperti klaim 1, dimana campuran asam lemak yang digunakan adalah konsentrat asam lemak omega-3 dari hasil samping pengalengan dan penepungan lemuru dan tuna, atau minyak kaya asam lemak
- 20 omega-3 dari hasil samping pengalengan tuna.
7. Suatu metode sintesis fosfolipid terstruktur mengandung asam lemak omega-3 seperti klaim 1,2, dan 3, dengan rasio asam lemak:fosfolipid berkisar 3,56-3,72:1 atau 3,5:1.
8. Suatu metode sintesis fosfolipid terstruktur mengandung asam lemak omega-3 seperti klaim 1, 2, dan 3, dengan lama inkubasi 23,64-25,10 jam atau 18 jam.
- 25 9. Suatu fosfolipid terstruktur mengandung asam lemak omega-3 dengan kadar EPA+DHA sebesar 21,29-35,97% atau 46,39-51,58%.

Abstrak

METODE PEMBUATAN FOSFOLIPID TERSTRUKTUR MENGANDUNG ASAM LEMAK OMEGA-3 DARI CAMPURAN FOSFOLIPID DAN KONSENTRAT ATAU MINYAK KAYA ASAM LEMAK OMEGA-3

Invensi ini bertujuan untuk mendapatkan fosfolipid terstruktur mengandung asam lemak omega-3 dari campuran fosfolipid dan campuran asam lemak. Campuran fosfolipid berupa fosfolipid kasar serat sawit atau lesitin kedelai komersial, sedangkan campuran asam lemak berupa konsentrat asam lemak omega-3 atau minyak kaya asam lemak omega-3. Sumber minyak yang digunakan adalah minyak hasil samping pengalengan dan penepungan lemuru dan tuna.

Metode sintesis fosfolipid terstruktur mengandung asam lemak omega-3 dengan tahapan sebagai berikut: melarutkan melarutkan campuran fosfolipid dan campuran asam lemak dalam pelarut dengan rasio asam lemak:fosfolipid berkisar 3,56-3,72:1 atau 3,5:1; menambahkan enzim lipase dari *Rizomucor miehei* pada konsentrasi 20 atau 30%; menambahkan air sebesar 10% dari berat substrat; melakukan inkubasi pada suhu 40°C dan digoyang pada 300 rpm selama 23,64-25,10 jam atau 18 jam; melakukan sentrifugasi untuk mengendapkan fosfolipid; dan melakukan pencucian fosfolipid terstruktur dengan heksana. Fosfolipid terstruktur mengandung asam lemak omega-3 yang diperoleh mengandung EPA dan DHA kadar EPA+DHA sebesar 21,29-35,97% atau 46,39-51,58%.